

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.22.016

慢性萎缩性胃炎大鼠 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍复合造模法模型评价

任金刚¹, 杨洋², 瞿先侯³, 尹璐³, 杨敏³, 严宁娟², 刘涛², 魏玮^{2*}

(1. 首都医科大学附属北京中医医院, 北京市东城区美术馆后街 23 号, 100010; 2. 中国中医科学院望京医院; 3. 北京中医药大学)

摘要 目的 评价慢性萎缩性胃炎 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (MNNG) 复合造模法的稳定性及对动物肝脏的影响。方法 60 只 SPF 级健康雄性 SD 大鼠随机分为正常组 8 只及造模 1 组、造模 2 组各 26 只。造模 1 组用 MNNG 复合高盐热淀粉糊法、造模 2 组采用 MNNG 复合乙醇灌胃法制备慢性萎缩性胃炎大鼠模型, 正常组正常饲养。造模时间 28 周。造模后比较造模 1 组、造模 2 组大鼠胃黏膜病理程度, 血清胃蛋白酶原 I (PG I)、胃蛋白酶原 II (PG II) 及肝脏病理改变。结果 造模 1 组大鼠 24 周出现腺体异型增生, 26 周出现灶性肠化生。造模 2 组大鼠 26 周出现个别腺体异型增生, 28 周出现灶性肠化生。模型 1 组死亡率为 26.9%, 模型 2 组为 15.4%。造模后造模 1 组、造模 2 组大鼠胃黏膜病理改变差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与正常组比较, 造模 1 组、造模 2 组血清 PG I、PG I/PG II 降低 ($P < 0.05$)。28 周造模 1 组及造模 2 组大鼠肝脏细胞均出现水样变性。结论 慢性萎缩性胃炎 MNNG 复合造模法造模时间较长, 模型死亡率较高, 并且对大鼠肝脏组织有一定影响。

关键词 慢性萎缩性胃炎; 复合造模法; 肝细胞水样变性; N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍; 乙醇

慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 是慢性胃炎的亚型之一, 是主要的胃癌前病变^[1]。目前现代医学无针对本病的特效药, 主要进行对症治疗及定期随访。中医药辨证治疗疗效较佳, 能缓解症状, 在延缓病理进展甚至逆转病变方面有一定优势^[2]。为了深入研究中医药治疗本病的机制需要用到 CAG 动物模型。动物实验研究是中医药研究常用的方法, 模型动物的肝脏结构及功能的改变直接影响药物安全性的评价, 因此, 中医药的动物实验研究首先需要排除造模药物对肝脏的影响。N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (MNNG) 是一种亚硝胺制剂, 是 CAG 模型常用的造模制剂之一, 其不依赖酶的代谢作用能直接作用于胃黏膜上皮, 可诱发 DNA 链上的碱基发生突变, 具有致癌作用^[3-4]。乙醇是另一常用的 CAG 复合造模的化学试剂, 研究显示, 长期摄入大量乙醇易造成模型动

物脂肪肝改变^[5]。本研究拟比较常用造模法 MNNG 复合低浓度乙醇与 MNNG 复合高盐热淀粉糊 CAG 大鼠模型成模时间及肝脏病理组织学改变的影响, 探究这两种造模方法的应用价值。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 60 只, 4 周龄, 体重 80~100 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物合格证号: SYXK (京) 20160021。

1.2 主要试剂及仪器

MNNG, 日本 TCI 东京化成工业发展有限公司 (货号: M0527), 用去离子水配制成浓度为 1 g/L 的母液, 存放于棕色避光容器中于 4℃ 冰箱冷藏备用, 每周制备 1 次, 用去离子水稀释成 120 μg/ml 的溶液备用, 整个过程均需避光保存; 雷尼替丁饲料: 用盐酸雷尼替丁胶囊 (赛诺菲安万特制药有限公司, 批号: 201601) 由北京科澳协力饲料有限公司协助制作含 0.03% 雷尼替丁的颗粒状 SPF 级大鼠饲料。水杨酸钠 (江西制药有限责任公司,

基金项目: 2015 年中医药行业科研专项 (201507001-09); 北京市科技计划 (Z161100001816016); 功能性胃肠病中医诊治北京市重点实验室

* 通讯作者: sxxtyy@sina.com

批号: 20160227); 10% 水合氯醛 (上海铭博生物科技有限公司, 批号: EXP201601); 75% 医用乙醇 (北京贞玉民生药业有限公司, 批号: 20160289); 药用氯化钠粉剂 (西安悦来医药科技有限公司, 批号 P20160203), 配置成含 15% 氯化钠、25% 可溶性高盐淀粉糊, 灌胃时加热保持在 60~70℃ 备用; 胃蛋白酶原 I (PG I) Elisa 试剂盒 (货号: E02P008)、胃蛋白酶原 II (PG II) Elisa kit 试剂盒 (货号: E02P0088), 均由 BlueGene Biotech 公司生产; HE 染色试剂盒 (Solarbio 公司, 批号: 20160218)。显微镜 (OLYMPUS 公司, 型号 BX51); 超低温冰箱 (厂家 SANYO, 型号 MED-382E)。

1.3 模型制备与分组

60 只 SD 大鼠采用软件 SPSS 19.0 随机分为正常组 8 只及造模 1 组、造模 2 组各 26 只。正常组正常饲养, 给予 5ml 生理盐水灌胃, 每天 1 次。造模 1 组用 0.03% 雷尼替丁饲料喂养, 每日自由饮用 2% 水杨酸钠溶液, 按大鼠体重予 10ml/kg MNNG 灌胃, 每日 1 次, 每周禁食 1 次, 每次 18h, 自第 14 周起禁食第 2 天灌胃高盐热淀粉糊 3ml, 当天不再灌胃 MNNG 溶液, 给药至 28 周。造模 2 组: 除自第 14 周起禁食第 2 天灌胃 35% 乙醇 3ml 外, 其余均同造模 1 组。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 一般状态 观察大鼠毛发颜色、活动状态、大便及视力情况。

1.4.2 胃黏膜病理组织学改变 从 18 周末起至 26 周末, 每组每两周处死 2 只, 剩余大鼠于第 28 周末统一处死。观察胃黏膜病理改变。取固定好的大鼠胃黏膜组织, 常规石蜡包埋, 切片, HE 染色观察各组大鼠胃黏膜萎缩、肠上皮化生、异型增生程度。参照文献 [6] 中标准, 采用直观模拟法对萎缩、肠上皮化生、异型增生程度进行分级, 分为无、轻度、中度、重度。

1.4.3 血清胃蛋白酶原 造模 28 周末 Elisa 法检测各组大鼠血清 PG I、PG II。

1.4.4 肝脏病理切片 造模 28 周末, 取大鼠肝脏组织, 常规 HE 染色, 显微镜下观察各组大鼠肝脏结构, 判断有无脂肪变及其他病理改变。

1.5 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析。计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较方差齐时用 LSD 法, 方差不齐时用 Dunnett T3 法。计数资料用 Fisher 精确检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况

正常组大鼠体形肥胖, 毛色光亮, 反应灵敏, 饮食、饮水量正常, 大便成形, 视力正常。造模 1 组、造模 2 组大鼠自第 17 周开始体形均明显较正常组瘦小, 皮毛发黄, 喜蜷卧扎堆, 反应迟钝, 部分大鼠大便质稀或小颗粒状、视力不佳。

2.2 各组大鼠死亡情况

造模 1 组大鼠于 18 周出现死亡, 至 26 周模型成功, 常规处死送病理学诊断大鼠 10 只, 异常死亡 7 只, 死亡率 26.9%, 异常死亡大鼠经解剖发现 5 只出现严重胃肠胀气, 2 只为灌胃呛咳窒息。造模 2 组 16 周开始出现大鼠死亡, 至 28 周模型成功, 常规处死送病理学诊断大鼠 10 只, 异常死亡 4 只, 死亡率 15.4%, 异常死亡大鼠经解剖发现 2 只出现肠胀气, 2 只为灌胃呛咳窒息。正常组大鼠无死亡。

2.3 各组大鼠胃黏膜病理组织学比较

造模 1 组大鼠第 20 周胃黏膜出现腺体减少, 24 周出现腺体异型增生, 26 周出现灶性肠上皮化生。造模 2 组大鼠第 24 周胃黏膜出现腺体减少, 26 周出现个别腺体异型增生, 28 周出现灶性肠上皮化生。表 1~表 4 示, 第 28 周末, 造模 1 组、造模 2 组大鼠胃黏膜病理组织学改变差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠造模第 28 周末胃黏膜病理改变比较 例 (%)]

组别	鼠数	前胃 异型增生	后胃 胃黏膜萎缩	后胃 肠上皮化生	后胃 异型增生
造模 1 组	9	5 (55.6)	9 (100)	2 (22.2)	4 (44.4)
造模 2 组	12	9 (75.0)	12 (100)	3 (25.0)	7 (58.3)

注: 经 Fisher 精确检验 $P = 0.686$

表 2 各组大鼠造模后第 28 周末胃黏膜萎缩程度比较 例 (%)]

组别	鼠数	无	轻度	中度	重度
造模 1 组	9	0	7 (77.8)	2 (22.2)	0
造模 2 组	12	0	8 (66.7)	2 (16.7)	2 (16.7)

注: 经 Fisher 精确检验 $P = 0.602$

表 3 各组大鼠造模后第 28 周末胃肠上皮化生程度比较 例 (%)]

组别	鼠数	无	轻度	中度	重度
造模 1 组	9	7 (73.8)	2 (22.2)	0	0
造模 2 组	12	9 (75.0)	2 (16.7)	1 (8.3)	0

注: 经 Fisher 精确检验 $P = 0.862$

表 4 各组大鼠造模后第 28 周末胃异型增生程度比较 例 (%)

组别	鼠数	无	轻度	中度	重度
造模 1 组	9	5 (55.6)	3 (33.3)	1 (11.1)	0
造模 2 组	12	5 (41.7)	5 (41.7)	1 (8.3)	1 (8.3)

注: 经 Fisher 精确检验 $P=0.554$

2.4 各组大鼠血清 PGI、PGII、PG I /PG II 比较

表 5 示, 各组间比较, PG I、PG I /PG II 差异有统计学意义 ($P<0.05$), PG II 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与正常组比较, 造模 1 组、造模 2 组血清 PG I、PG I /PG II 降低 ($P<0.05$)。

表 5 各组大鼠血清 PG I、PG II、PG I /PG II 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	PG I (ng/ml)	PG II (ng/ml)	PG I /PG II
正常组	8	17.30 $\pm$ 5.87	0.47 $\pm$ 0.34	46.47 $\pm$ 25.83
造模 1 组	9	11.03 $\pm$ 3.21*	0.69 $\pm$ 0.26	17.95 $\pm$ 8.39*
造模 2 组	12	12.61 $\pm$ 4.66*	0.81 $\pm$ 0.34	17.72 $\pm$ 8.15*

注: PG I, 胃蛋白酶原 I; PG II, 胃蛋白酶原 II; 与正常组比较, * $P<0.05$

2.5 各组大鼠肝脏病理结果

图 1 示, 正常组大鼠肝脏可见肝小叶结构规则, 肝细胞形态正常; 造模 1 组重度肝细胞水样变性, 肝小叶结构不清, 肝细胞肿大, 胞核位于细胞中央, 胞质疏松, 内含粉红色嗜酸性颗粒; 造模 2 组: 中-重度肝细胞水样变, 肝细胞胀大, 胞浆淡染清亮, 核稍增大。

3 讨论

本实验根据参考文献 [7-8] 进行模型的探索。对于干预方式的选择, 原文献造模法 MNNG 为自由饮用法^[7], 但根据预实验, MNNG 因溶液有特殊的气味, 大鼠表现出厌恶饮用的行为, 饮水量较正常大鼠明显减少, 无法保证 MNNG 的摄入量。而水杨酸钠溶液无刺激性气味, 大鼠的接受度较高, 能保证每日基本饮水量, 故本次实验选用 MNNG 灌胃、水杨酸钠自由饮用的给药方式。对于 MNNG 浓度的选择, 有研究提示 0.07 mmol/L

MNNG 溶液灌胃并不能提高模型诱变率, 并且会使大鼠死亡率上升, 出现明显前胃鳞状上皮病变^[8]。胃鳞癌与 CAG 病变无关, 属于本病模型制备过程中应避免的并发症。本实验结果显示, 用 120 μ g/ml MNNG 持续灌胃 28 周, 造模 1、2 组大鼠前胃并未发生鳞癌, 但均出现轻度异型增生, 提示长期 120 μ g/ml MNNG 可能引发鳞癌, 在 CAG 模型的制备中需注意。

本实验结果显示, 造模 2 组模型稳定需 28 周, 较造模 1 组延迟 2 周, 但死亡率较低。病理方面, 28 周之内造模 1 组、造模 2 组大鼠的胃黏膜萎缩诱变率均达到 100%, 两组肠上皮化生、异型增生程度均较低。有文献报道, 乙醇灌胃可增加大鼠肝对 MNNG 致突变性的抑制作用^[9], 可能机制为乙醇导致大鼠肝内解毒酶活性及其辅因子浓度增加, 这可能是乙醇复合模型成模时间较长的原因之一。

PG I 主要由胃底腺的主细胞和黏液细胞分泌, 胃黏膜腺体萎缩时 PG I 降低, 因此血清 PG I 可以作为胃体萎缩血清学标记物^[10]。PG II 是由胃贲门腺、胃窦部的幽门腺和十二指肠 Brunner 腺体产生。当慢性炎症导致萎缩进展时, 主细胞被假幽门腺代替, PGI 水平下降, PGII 合成增加, 导致 PGI/PG II 水平下降^[11]。两模型组对比正常组, PG I、PG I /PG II 均降低, 提示两种造模方法均造成了胃分泌功能的降低, 符合慢性萎缩性胃炎改变, 也与实验病理改变相符。

有研究发现, 30% 酒精灌胃 10 周后大鼠出现肝细胞脂肪变, 汇管区血管、血窦及小叶中央静脉扩张充血, 但未出现坏死及纤维化^[9]。本实验发现造模 1、2 组均出现肝细胞水样变性, 两组肝细胞变性程度未见明显差别, 未见明显脂肪性改变。造模 1、2 组均发生肝细胞水样变性, 可能是由于 MNNG 对于肝细胞的作用, 但作用机制尚不清楚。大量乙醇灌胃大鼠可能出现肝细胞脂肪变, 而水样变性是脂肪变的早期改变, 推测乙醇灌胃可能是造成肝损害的因素之一。

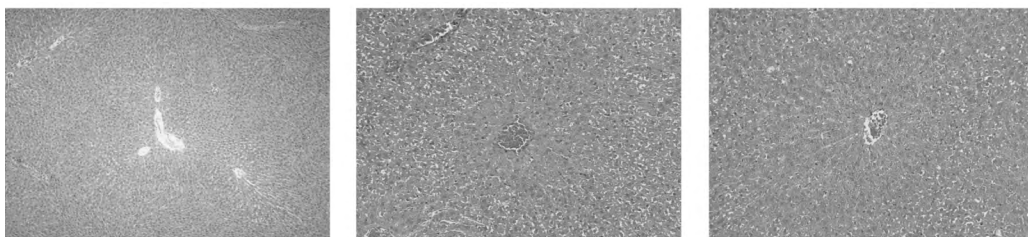


图 1 各组大鼠肝脏病理结果 (HE 染色, $\times 20$)

总之, 本实验发现常用 MNNG 复合造模方法存在造模时间较长, 模型死亡率较高, 并且对大鼠肝脏有一定影响, 对于药物的治疗评价存在一定影响。

参考文献

- [1] CORREA P, HAENSZEL W, CUELLO C, et al. A model for gastric cancer epidemiology [J]. Lancet, 1975, 2 (7924): 58-60.
- [2] 姜宁, 黄宣, 范一宏, 等. 中西医结合治疗胃癌前病变疗效的系统评价 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(1): 149-154.
- [3] CALABRESE EJ, BALDWIN LA. Can the concept of hormesis be generalized to carcinogenesis? [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 1998, 28(3): 230-241.
- [4] ZAIDI NH, OCONNOR PJ, BUTLER WH. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced carcinogenesis: differential pattern of upper gastrointestinal tract tumours in Wistar rats after single or chronic oral doses [J]. Carcinogenesis, 1993, 14(8): 1561-1567.

- [5] 冯秀雪, 令狐恩强. 慢性萎缩性胃炎的动物模型研究 [J]. 军医进修学院学报, 2012, 33(6): 668-671.
- [6] DIXON MF, GENTA RM, YARDLEY JH, et al. Classification and grading of gastritis. The updated sydney system. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994 [J]. Am J Surg Pathol, 1996, 20(10): 1161-1181.
- [7] 孔祥茹, 杨岩, 李慧臻, 等. MNNG 不同给药剂量及途径对大鼠胃黏膜组织病理学的影响 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2015, 23(6): 381-384, 389.
- [8] 姚瑶, 林晓春, 雷晓林, 等. 慢性萎缩性胃炎大鼠模型的建立及稳定性评价 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(4): 162-166.
- [9] 周宗灿, LIEBER CS, GARRO AJ. 喂饲酒精对大鼠肝抑制 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍致突变性的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1987, 1(2): 110-115.
- [10] 邓娜, 宫月华. 胃黏膜“血清学活检”与萎缩性胃炎 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2015, 24(2): 136-139.
- [11] 赵洪林, 刘彤. 胃蛋白酶原检测在胃癌诊治中的应用进展 [J]. 山东医药, 2008, 48(3): 112-113.

Evaluation of a Compound Modeling Method with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine for Establishing Chronic Atrophic Gastritis Model Rats

REN Jingang¹, YANG Yang², QU Xianhou³, YIN Lu³, YANG Min³, YAN Ningjuan², LIU Tao², WEI Wei²
(1. Beijing Chinese Medicine Hospital, Capital Medical University, Beijing 100010; 2. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences; 3. Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To evaluate the stability of a compound modeling method of chronic atrophic gastritis with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and its effect on animal hepatocytes. **Methods** Sixty specific-pathogen-free healthy male Sprague Dawley rats were randomly divided into a normal group (n=8), a model group 1 (n=26) and a model 2 group (n=26). The model group 1 adopted MNNG combined with high salt hot starch paste method and the model 2 group adopted MNNG combined with ethanol gavage method to prepare rat model with chronic atrophic gastritis. The normal group received normal feeding. Rats underwent modeling for twenty eight weeks. Gastric mucosa pathological degree, serum levels of pepsinogen I (PG I) and pepsinogen II (PG II), and the change of liver pathology of rats in the model group 1 and the model 2 group were compared after modeling. **Results** Rats in the model group 1 had gland hyperplasia at the 24 week, and had focal intestinal metaplasia at the 26 week. Rats in the model 2 group had individual gland hyperplasia at the 26 week, and had focal intestinal metaplasia at the 28 week. The mortality rate was 26.9% in the model 1 group, and 15.4% in the model 2 group. After modeling, there was no statistically significant difference in gastric mucosa pathological changes between rats in the model 1 and in the model 2 group (P>0.05). Compared with those in the normal group, serum levels of PGI, and PGI/PG II in the model 1 group and model group 2 decreased (P<0.05). At the 28 week of modeling, hepatocytes of both rats in the model 1 group and model group 2 appeared hydropic degeneration. **Conclusion** The MNNG compound modeling method of establishing model of chronic atrophic gastritis needs longer modeling time. It is with high mortality, and has a certain effect on the liver tissue of rats.

Keywords chronic atrophic gastritis; compound modeling method; hepatocyte hydropic degeneration; N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; ethanol

(收稿日期: 2017-08-29; 修回日期: 2017-10-20)

编辑: 王利芬